

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Katarina Brajković

7027/BT

PRAĆENJE UČINAKA EKSTRAKTA ĐUMBIRA NA TUMORSKOJ
STANIČNOJ LINIJI HeLa

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija vitamina i hormona

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Praćenje učinaka ekstrakta đumbira na tumorskoj staničnoj liniji HeLa

Katarina Brajković, 0058206541

Sažetak: *In vitro* testovima toksičnosti, može se ispitati biološka aktivnost određenih spojeva iz biljaka, a potom i procijeniti mogući učinak na ljude. Utvrđeno je da djelovanje navedenih tvari ima zaštitni učinak kod širokog raspona tumorskih oboljenja, koronarnih bolesti i srčanog udara. Stoga, sve se više ispituje primjena biološki aktivnih tvari iz biljaka kao izvora novih lijekova. U istraživanjima, koja često uključuju *in vitro* testove, rabe se različite humane stanične linije. U ovom radu, provedeno je *in vitro* ispitivanje učinka subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na tumorsku HeLa staničnu liniju te se pratila promjena u preživljavanju i morfologiji stanica. Rezultati su pokazali inhibitorno djelovanje ekstrakta na preživljavanje stanica, odnosno minimalnu inhibiciju od 3,99% kod tretmana s 5 mg/mL ekstrakta te maksimalnu inhibiciju od 80,96% prilikom tretmana s 50 mg/mL ekstrakta. Također, određene su i morfološke promjene u HeLa stanicama nakon djelovanja ekstrakta đumbira, koje su u skladu s rezultatima određivanja preživljavanja. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal primjene đumbira kao izvora biološki aktivnih spojeva.

Ključne riječi: *in vitro* testovi, đumbir, HeLa stanice, vijabilnost

Rad sadrži: 30 stranica, 5 slika, 1 tablica, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i električkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Pomoć pri izradi: -

Datum obrane: 18. lipnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Screening of ginger extract effects on HeLa tumor cell line

Katarina Brajković, 0058206541

Abstract: *In vitro* toxicity assays can be used to investigate the biological activity of certain compounds from the plants and then evaluate the potential effect on humans. It has been established that the activities of such substances have a protective effect toward different types of tumors, coronary diseases and heart attack. Therefore, the use of biologically active substances as the source of new drugs is being tested more and more. In researches that often include *in vitro* tests, different human cell lines are being used. In this study, the *in vitro* testing of the subcritical water extract effect of ginger to human tumor cell HeLa has been carried out. The alteration in cell survival and morphology was observed. The results showed the inhibitory effect of extract on cell survival, respectively a minimum inhibition of 3.99% for 5 mg/mL extract treatment and maximum inhibition of 80.96% for 50 mg/mL extract treatment. Also, morphological changes in HeLa cells were determined after the action of ginger extract. They are consistent with survival results. The obtained results indicate the potential of ginger application as a source of biologically active compounds.

Keywords: *in vitro* assays, ginger, HeLa cells, viability

Thesis contains: 30 pages, 5 figures, 1 table, 32 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Višnja Gaurina Srček, Ph.D. Full Professor

Technical support and assistance: -

Defence date: 18th June 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Kultura stanica	2
2.1.1. Proizvodi kulture stanica	3
2.1.2. Hranjivi medij za uzgoj životinjskih stanica	4
2.1.3. Dodaci mediju za uzgoj : serum	6
2.1.4. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica	7
2.1.5. Primjena <i>in vitro</i> testova	9
2.2. Subkritična ekstrakcija vodom	10
2.3. Đumbir <i>Zingiber officinale</i> i njegov učinak na ljudsko zdravlje	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijali	13
3.1.1. HeLa stanična linija	13
3.1.2. Kemikalije.....	14
3.1.3. Otopine i puferi.....	14
3.1.4. Uređaji i oprema	15
3.2. Metode rada	16
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	16
3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na HeLa staničnoj liniji	17
3.2.4. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom	17
3.2.5. Klonogeni test i bojanje HeLa stanica bojom kristal violet	18
3.2.6. Fluorescentna mikroskopija	18
4. REZULTATI	19
4.1. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na preživljavanje HeLa stanica	19

4.2. Klonogena analiza učinka subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na HeLa stanice.....	20
4.3. Fluorescentna mikroskopija HeLa stanica nakon tretmana subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira.....	22
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČCI.....	27
7. LITERATURA.....	28

1. UVOD

Tumori ili neoplazme nastaju kao posljedica abnormalne proliferacije stanica koje uspijevaju izbjeći obrambene mehanizme organizma. Mogu biti dobroćudni (benigni) ili zloćudni (maligni) koji se još nazivaju i rak. Ovisno o vrsti stanica, odnosno tkiva iz kojih nastaju, zloćudni tumori dalje se dijele na karcinome (tumori epitelnog tkiva), sarkome (tumori vezivnog i potpornog tkiva), leukemije (tumori krvnih stanica), melanome (tumori koji potječu od melanocita) i druge. Rak dojke vodeći je rak u svijetu po učestalosti u žena, a slijedi ga rak vrata maternice (Cooper i Hausman, 2004).

Biljke i biljni derivati potencijalni su izvori biološki aktivnih spojeva koji su sposobni ometati kancerogene procese. Budući da je rak širom svijeta primarni doprinos morbiditetu i mortalitetu, nije iznenađenje da je identificiranje biljaka i biljnih derivata pridobilo značajan interes (Mahady i sur., 2003). Đumbir (*Zingiber officinale*) je biljna vrsta koja je doživjela svjetsku popularnost kao začín i tradicionalni lijek. Još od antičkog doba koristi se u medicinske svrhe za široki spektar oboljenja poput artritisa, reumatizma, upale grla, vrućice, uganuća, mišićnih i drugih bolova, konstipacije, povraćanja, demencije, hipertenzije i nekoliko drugih poremećaja (Kirana i sur., 2003).

Kako bi se poboljšali postupci dobivanja biljnih ekstrakata i smanjila uporaba organskih otapala, razvile su se nove, ekološki prihvatljive i učinkovite metode kao što je subkrična ekstrakcija vodom. Pritom se kao otapalo koristi voda koja posjeduje jedinstvena svojstva poput neproporcionalno visoke temperature vrelišta u odnosu na masu, visoke dielektrične konstante i visoke polarnosti (Huie, 2002).

Stanična linija HeLa prvi put je izolirana 1951. iz adenokarcinoma vrata maternice pacijentice Henriette Lacks i u potpunosti prilagođena na *in vitro* uzgoj u laboratorijskim uvjetima. Kao tumorska stanična linija, može se neograničeno umnažati dok su joj osigurane hranjive tvari i uvjeti uzgoja. Danas se koristi u brojnim laboratorijima za ispitivanja kontrole lijekova, praćenje učinka različitih spojeva, a također je pogodna kao domaćin za ekspresiju različitih rekombinantnih proteina i cjepiva (Hendrick i sur., 2006). S obzirom na primjenu ove stanične linije, istraživanja kinetike rasta i uvjeta uzgoja od velike su važnosti za temeljna istraživanja i biotehnološku primjenu.

U ovome radu korištena je tumorska stanična linija HeLa, a cilj rada bio je ispitati učinak subkričnog vodenog ekstrakta đumbira na preživljavanje i morfološke karakteristike HeLa stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kultura stanica

Kultura tkiva prvi put je opisana 1907. godine, kada su Harrison i suradnici izolirali i kultivirali komadiće tkiva iz medularnog kanala žabljeg embrija. Tek pedesetih godina prošlog stoljeća, stanice se počinju uzgajati kao kultura stanica, a pojam kultura tkiva danas se koristi i za kulturu organa i kulturu stanica (Witkowski, 1979).

Moderne biotehničke znanosti sve se više bave tehnikom uzgoja kulture stanica, prvotno upotrebljavanom za proučavanje ponašanja stanica i tkiva *in vitro*. Nakon izolacije iz originalnog tkiva, stanice odumiru nakon samo nekoliko udvostručenja *in vitro*. Problem ograničenog životnog vijeka stanica rješava se transformacijom u besmrtnu, uspostavljene ili kontinuirane stanične linije. Napredak u primjeni kulture stanica zabilježen je nakon što su regulatorne agencije prihvatile uporabu kontinuiranih staničnih linija (Slivac i sur., 2016).

Stanice u kulturi žive, rastu i dijele se, odnosno metabolički su aktivne i prolaze kroz faze staničnog ciklusa: faza zastoja ili prilagodbe (lag-faza), eksponencijalna faza ili faza logaritamskog rasta (log-faza) i stacionarna faza. Fazu zastoja karakterizira pričvršćivanje stanica za podlogu i prilagodba na nove uvjete. Stanice se u toj fazi ne razmnožavaju, ali su metabolički aktivne. Eksponencijalna faza je faza učestalih dioba u kojoj je vrijeme umnožavanja stanica gotovo jednako vremenu diobe stanica diobenog ciklusa. Kako se faza približava kraju, vrijeme umnožavanja se usporava. U stacionarnoj fazi rasta broj stanica se više ne mijenja, stanice izlaze iz diobenog ciklusa i ulaze u fazu mirovanja, iako je vijabilnost i preživljenje isto kao i kod stanica koje se dijele (Freshney, 1987).

Pod kulturom stanica podrazumijeva se proces u kojem prokariotske, eukariotske ili biljne stanice rastu u kontroliranim uvjetima, a izraz se najčešće odnosi na uzgoj kultura životinjskih stanica. Uzgoj započinje izolacijom stanica iz specifičnih životinjskih tkiva (kože, jetre, žlijezda i dr.) te daljnjom kultivacijom i reprodukcijom istih u umjetnom hranjivom mediju (Eibl i sur., 2009). Naime, uspostavljene kulture životinjskih stanica relativno jednostavno i neograničeno rastu u suspenziji, što je omogućilo uzgoj u većem volumenu, odnosno u bioreaktorima koji su već bili poznati iz bakterijskog uzgoja. Prvi komercijalni proizvod ove tehnologije je cjepivo protiv dječje paralize. Virusna cjepiva, monoklonska protutijela, interferoni te rekombinantni terapijski proteini samo su neki od proizvoda dobivenih iz stanica (Slivac i sur., 2016).

2.1.1. Proizvodi kulture stanica

Kultura životinjskih stanica primjenjuje se s ciljem dobivanja velikog broja korisnih proizvoda koje drugim postupcima nije moguće proizvesti ili je tehnološki neisplativo. Razvijeni proizvodi neophodni za ljudsku uporabu su cjepivo protiv polio virusa, hepatitisa B, ospica i zaušnjaka dok su za veterinarsku uporabu važni cjepivo protiv rubeole i bjesnoće. Novi ciljevi, koji su uspostavljeni, uključuju razvoj cjepiva protiv virusa humane imunodeficijencije (HIV-a) te virusa herpes simplex.

Rekombinantne proteine mogu proizvoditi bakterijske, kvaščeve ili stanice sisavaca. Domaćini poput bakterija ili kvasaca imaju prednost u pogledu brzine rasta, konačne gustoće stanica i koncentracije produkata. Ipak, stanice sisavaca poželjne su za proizvodnju proteina koji zahtijevaju glikolizaciju kao u ljudi. Također, kod stanica sisavaca dolazi do oslobađanja proizvedenih proteina van stanice, dok se proizvodi mikroorganizama često nakupljaju intracelularno u inkluzijskim tjelešcima, što zahtjeva kompleksniji *down-stream* proces.

Iz kulture stanica sisavaca mogu se dobiti i glikoproteini. Počevši od proizvodnje α -interferona kao lijeka protiv infekcije pomoću ne-rekombinantnih stanica, sve veći broj glikoproteina zaslužnih za liječenje širokog spektra bolesti, proizvode uglavnom rekombinantne stanice sisavaca. Istaknuti primjeri su citokini, hematopoetski faktori rasta (npr. eritropoetin za liječenje anemije), hormon rasta, trombolitički agensi, faktori koagulacije (faktor VII, faktor VIII, faktor IX, itd.) i rekombinantni enzimi.

Životinjske stanice mogu biti korištene kao proizvod. Pritom veliku ulogu imaju stanice raka i neke vrste primarne kulture stanica. Primjenjuju se u toksikološkim ispitivanjima novih lijekova, kozmetičkih pripravaka i industrijskih spojeva (Eibl i sur., 2009).

2.1.2. Hranjivi medij za uzgoj životinjskih stanica

Tijekom posljednjih 30 godina, razvijeni su brojni mediji danas standardizirani i komercijalno dostupni te prilagođeni za rast različitih tipova stanica. Glavna funkcija medija je osiguravanje odgovarajuće pH vrijednosti i osmotskog tlaka potrebnog za preživljavanje i umnažanje stanica te opskrba hranjivim tvarima neophodnim za rast.

Eagleov osnovni medij (*Eagle's Basal Medium* - BME) originalno je oblikovan za rast mišjih L i HeLa stanica, a dodatkom veće koncentracije aminokiselina nastaje Eagleov minimalni esencijalni medij (*Eagle's Minimum Essential Medium* - EMEM) koji se koristi za uzgoj brojnih staničnih linija. Nadalje, povećanjem koncentracije aminokiselina i vitamina četiri puta u odnosu na osnovni medij, dobije se Dulbeccova modifikacija Eagleovog medija (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* – DMEM).

Medij za uzgoj životinjskih stanica kompleksna je smjesa ugljikohidrata, aminokiselina, vitamina, hormona, soli i faktora rasta. Takav medij potrebno je nadopunjavati različitim sastojcima za *in vitro* uzgoj kroz duži period (Slivac i sur., 2016).

U medij se najčešće dodaje 5-25 mM glukoze kao izvor energije i ugljika te kao preteča u biosintezi riboze, neophodne za sintezu nukleinskih kiselina. Glukoza se metabolizira uglavnom glikolizom do piruvata, koji se dalje prevodi u laktat ili acetyl-CoA. Nastali spoj acetyl-CoA može ući u ciklus limunske kiseline, čiji intermedijari uz proteine, peptide, nukleozide, lipide i piruvate, čine sastav kompleksnih medija.

Pojedinačni zahtjevi za količinu aminokiselina u mediju razlikuju se od jednog do drugog tipa stanica, a često su prisutne u rasponu od 0,1-0,2 mM i služe kao prekursori u sintezi proteina. Dodaju se esencijalne aminokiseline arginin, cistein, fenilalanin, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofan, tirozin i valin. Neesencijalne aminokiseline alanin, asparagin, asparaginska kiselina, prolin, glicin i serin dodaju se ovisno o potrebama stanične linije. Većini stanica potreban je glutamin koji se dodaje u znatno višoj koncentraciji od ostalih aminokiselina (2-4 mM) i služi kao izvor energije i ugljika, prekursor u sintezi purina, pirimidina, asparagina te kao preteča za intermedijare ciklusa limunske kiseline, iako neke stanične linije radije koriste glutamat.

U niskim koncentracijama najčešće se dodaju biotin, folna kiselina, inozitol i nikotinamid, odnosno vitamini B skupine. Djeluju kao koenzimi enzima, a njihov sadržaj ovisi o vrsti medija u koji se dodaju. Biotin je prisutan u većini složenijih medija, uključujući medije bez seruma, a para-aminobenzojeva kiselina (PABA) u M199, CMRL 1066 izvedenom iz M199 i

RPMI 1640. Vitamin A prisutan je u LHC-9, vitamin E u MCDB 110, a svi vitamini topljivi u mastima (A, D, E i K) prisutni su samo u M199. Uz hormon inzulin dodaju se i glukokortikoidi (deksametazon i hidrokortizon), hormoni koji povećavaju unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a te steroidni hormoni topljivi u vodi.

Također, dodaju se anorganske soli Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- koje utječu na osmotski pritisak medija i održavanje ionske ravnoteže. Za održavanje optimalne pH vrijednosti oko 6 zaslužni su bikarbonat zajedno s 5-10 % plinovitog CO_2 iz atmosfere u inkubatoru. Nakon što se kultura izvadi iz inkubatora, medij se brzo zaluži, što predstavlja glavni nedostatak bikarbonata kao pufera.

Faktori rasta dodaju se u medij za stimulaciju specifičnih staničnih funkcija i za povećanje proliferacije stanica. Samo mali broj faktora rasta ima pozitivan učinak na više različitih vrsta stanica, dok je većina visokospecifična za određenu vrstu stanice. Neke stanice imaju sposobnost otpuštanja faktora rasta, čime stimuliraju vlastiti rast i rast okolnih stanica.

Antibiotici su u početku uvedeni u medij kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije. Zbog današnjih unaprijeđenih aseptičnih tehnika, antibiotici gube na važnosti. Zapravo, njihovu je upotrebu poželjno izbjegavati kako ne bi došlo do pojave mikroorganizama rezistentnih na antibiotike. Također, moguć je nepovoljan utjecaj na proliferaciju stanica i mogu dovesti do promjene uvjeta u samoj kulturi.

Od elemenata u tragovima dodaju se Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Va i Zn i većina ih je važna za enzimsku aktivnost i preživljavanje stanica. Antioksidacijsko svojstvo selena ima važnu ulogu u rastu stanica, dok je kalcij bitan za diobu i prijenos signala između stanica, a soli željeza mogu se koristiti kao zamjena za nosač željeza – transferin.

Naposljetku, potrebno je voditi brigu o kvaliteti vode, korištene prilikom uzgoja kulture životinjskih stanica, jer prisutnost kontaminanata znatno mijenja kvalitetu medija za uzgoj. Kao metode pročišćavanja koriste se reverzna osmoza, filtracija kroz mikropore i deionizacija (Freshney, 2005).

2.1.3. Dodaci mediju za uzgoj : serum

Serum je vrlo kompleksnog i kemijski nedefiniranog sastava, a glavne sastavnice čine proteini i tvari nužne za proliferaciju stanica te biomolekule koje potiču ili inhibiraju stanični rast. Definira se kao bezstanična krvna komponenta dobivena zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla. Najčešće se koriste fetalni teleći serum (*Fetal Calf Serum* - FCS) i fetalni goveđi serum (*Fetal Bovine Serum* - FBS), koji ima visok sadržaj embrionalnih faktora rasta. Ponekad se koristi humani serum u kombinaciji s nekim humanim staničnim linijama, ali mora se provjeriti mogućnost infekcije virusima kao što su HIV i hepatitis B.

Prirodna pojava ugruška seruma stimulira proliferaciju stanica više od seruma iz kojeg su stanice fizički uklonjene (centrifugiranjem), zbog oslobađanja faktora rasta iz trombocita (*Platelet-Derived Growth Factor* - PDGF) tijekom zgrušavanja. PDGF predstavlja glavni faktor rasta prisutan u serumu i dok on stimulira rast fibroblasta, drugi faktori rasta iz trombocita, kao što je TGF- β , mogu inhibirati rast ili poticati diferencijaciju u epitelnim stanicama. Ostali faktori rasta su epidermalni faktor rasta (EGF), vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), inzulinu slični faktori rasta (IGF-I i IGF-II) i mnogi drugi komercijalno dostupni faktori rasta u obliku rekombinantnih proteina (Freshney, 2005).

Serum se obično dodaje mediju za uzgoj, u volumnom udjelu 5-10% (v/v), čime se osiguravaju osnovni nutrijenti (aminokiseline, minerali, vitamini i dr.), vezni proteini, faktori zaštite od mehaničkog oštećenja, inhibitori proteaza, itd. Međutim, dodatak seruma ima i određene nedostatke kao što su kemijska nedefiniranost, razlike u sastavu među pojedinim šaržama seruma, visoka cijena i mogućnost prisutnosti kontaminanata poput bakterija, gljivica ili virusa. Također, proteini iz seruma mogu otežavati izolaciju i pročišćavanje proizvoda te stvarati probleme u biotehnološkoj proizvodnji (Butler, 2004).

Primjenom medija bez seruma (serum-free medij) nastoje se izbjeći spomenuti nedostaci. Glavne prednosti serum-free medija čine selektivnost prema određenom tipu stanica, koja nudi mogućnost standardizacije sastava medija, te mogućnost regulacije proliferacije i diferencijacije stanica (mijenjanjem koncentracije i vrsta faktora rasta). Svojstva poput sporije proliferacije stanica, niže maksimalne koncentracije stanica, manjeg maksimalnog broja generacija kod konačnih staničnih linija te visoke cijene potrebnih dodataka (hormona i faktora rasta) kod primjene serum-free medija, ne mogu se izbjeći (Brunner i sur., 2010).

2.1.4. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Kako bi se postigao uspješan rast životinjskih stanica u *in vitro* uvjetima, potrebno je osigurati optimalne vrijednosti nekoliko fizikalno-kemijskih parametara koji moraju zamijeniti *in vivo* uvjete, a to su sljedeći: temperatura, pH vrijednost, koncentracija plinova (CO_2 i O_2), osmolarnost i viskoznost (Castilho i sur., 2008).

Optimalna temperatura za uzgoj kulture životinjskih stanica ovisi o temperaturi tijela domaćina, iz kojeg su stanice izolirane, a kreće se u rasponu 35-37°C. Postoje i slučajevi kod kojih stanične linije potječu od hladnokrvnih životinja, stoga optimalna temperatura za njihov uzgoj iznosi 15-26°C. Temperature niže od optimalnih usporavaju rast kulture, dok je povišenje temperature na 39-40°C za većinu kultura letalno. Inkubator se podešava na temperaturu nešto nižu od optimalne, kako bi se izbjegla opasnost od pregrijavanja kulture, a pritom treba obratiti pažnju na odstupanje od optimalnih vrijednosti, koje ne smije biti veće od $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Optimalna pH vrijednost razlikuje se ovisno o tipu stanica, a za većinu životinjskih stanica ona iznosi 7,4. Neke transformirane stanične linije pokazuju bolji rast i uspješno razmnožavanje kod nižeg pH (7,0-7,4), a neke stanične linije fibroblasta svoju funkciju najbolje obavljaju pri višem pH 7,4-7,7 (Eagle, 1973). Kao pH indikator često se koristi fenol crveno koji djeluje na principu različitog obojenja prilikom promjene pH vrijednosti. Pri optimalnoj pH vrijednosti za uzgoj životinjskih stanica, očituje se crvena boja, prijelazom u kiseliye područje boja postaje narančasta potom žuta, a lužnato područje daje ružičasto i ljubičasto obojenje. Vrijednosti pH mogu se regulirati puferskim sustavom hidrogenkarbonat- CO_2 koji se odupire promjeni pH vrijednosti.

Na pH vrijednost utječe ravnoteža između CO_2 u plinovitoj i tekućoj fazi i to tako da se otapanjem CO_2 posljedično snizuje pH. U inkubatorima se nalazi kontrolirana atmosfera s najčešće 5% CO_2 (parcijalni tlak $\text{CO}_2 = 40 \text{ mmHg}$).

Drugi značajni sastojak plinske faze je kisik. Za većinu kultura stanica dovoljan je atmosferski kisik, a za kulture tkiva nužno je osigurati do 95% kisika u kontroliranoj atmosferi. Zbog slabe topljivosti u vodi i vodenim otopinama, koju dodatno potiču sastojci podloge poput soli i glukoze, kisik je limitirajući faktor procesa uzgoja kulture stanica. Također, na njegovu topljivost utječu i temperatura te parcijalni tlak kisika u plinovitoj fazi. Proporcionalna je parcijalnom tlaku kisika, a obrnuto proporcionalna temperaturi.

Osmotska koncentracija može se izraziti kao osmolarnost, tj. u obliku broja mmola po litri otopine ili kao osmolalnost, tj. kao broj mmola po kilogramu otapala. Optimalna osmolalnost medija za uzgoj većine stanica je 260-320 mOsmol/kg, a kao srednja vrijednost uzima se 287 mOsmol/kg i tijekom uzgoja ne bi trebala odstupati više od ± 10 mOsmol/kg. Povećana osmolalnost medija uzrokuje negativnu promjenu u rastu i proliferaciji stanica. Negativan utjecaj na osmolarnost hranjivog medija imaju iscrpljivanje sastojaka male molekulske mase, dodavanje pretoničnih otopina za prihranjivanje i pretjerano doziranje lužina ili kiselina za korekciju pH.

Viskoznost medija je pod utjecajem serumskog sadržaja i uglavnom nema učinka na rast stanica u kulturi. Poznavanje tog parametra najbitnije je prilikom korištenja sustava za miješanje stanica i nakon tripsinizacije, kada su stanice disocirane. Bilo kakvo oštećenje stanica koje se javlja u ovim uvjetima, može se smanjiti povećanjem viskoznosti medija dodavanjem karboksimetilceluloze (*CarboxyMethyl Cellulose* - CMC) ili polivinilpirolidona (*PolyVinylPyrrolidon* – PVP) (Freshney, 2005).

2.1.5. Primjena *in vitro* testova

Izvođenjem niza testova na različitim organizmima (*in vivo*) ili na kulturama životinjskih stanica (*in vitro*), određuje se biološka aktivnost određenih spojeva iz biljaka nakon čega se procjenjuje njihov učinak na ljude (Kniewald i sur., 2005).

Već se desetljećima nastoji smanjiti broj pokusnih životinja te svesti na minimum njihova bol, patnja i uznemirenost koje izvođenje testova uzrokuje. Upravo zbog toga u razvoju je 3R pristup (*Reduce, Refine, Replace*) odnosno zamjena *in vivo* testova alternativnim *in vitro* testovima citotoksičnosti, gdje god je moguće. Iako *in vitro* testovi ne mogu u potpunosti odgovoriti na pitanja tkivno-specifične toksičnosti i metaboličkih promjena, istraživanja pokazuju podudarnost rezultata oko 80%.

Kada se provode *in vitro* testovi toksičnosti, određuje se bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari neophodne za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu. Prednosti uporabe *in vitro* testa su niža cijena u odnosu na *in vivo* testove, visok stupanj standardizacije, brzina izvođenja, manja količina toksičnog otpada te dobrobit eksperimentalnih životinja zbog čega je razvoj opisanog testa započet.

Pri uspostavljanju kulture, stanice zadržavaju većinu specifičnih funkcija i svojstva tkiva iz kojeg su potekle, stoga primarna kultura najbolje odražava *in vivo* uvjete i najprikladnija je za ispitivanja. Često korišten *in vitro* test, za određivanje citotoksičnosti kemikalija primjenom kultura stanica, je test redukcije tetrazolijeve soli, MTS test, u nastavku detaljnije opisan (Radojčić Redovniković i sur., 2016).

2.2. Subkritična ekstrakcija vodom

U razvoju novih farmaceutskih pripravaka, prvi i najvažniji korak je ekstrakcija i separacija biološki aktivnih tvari, što može biti vrlo složeno. Ekstrakcija otapalom, destilacija vodenom parom i sublimacija samo su neke od metoda koje se primjenjuju za ekstrakciju fitokemikalija iz biljnog materijala. Moguća je primjena jednog ili više organskih otapala, ali se vrsta i koncentracija moraju pažljivo birati, kako ne bi došlo do strukturnih promjena ciljanih tvari, što može negativno utjecati na njihova fizička, kemijska i biološka svojstva. Posljednjih godina, javile su se nove tehnologije i metode za ekstrakciju kao što su mikrovalna ekstrakcija, ultrazvuk, ekstrakcija superkritičnim CO₂, membranske tehnologije izdvajanja te subkritična ekstrakcija vodom.

Subkritična ekstrakcija vodom, ekstrakcija vrućom vodom, ekstrakcija vodom pod tlakom, ekstrakcija vodom pri visokoj temperaturi ili ekstrakcija pregrijanom vodom, tehnika je koja se temelji na vodi kao ekstrakcijskom otapalu. Uobičajena ekstrakcija potencijalno toksičnim, organskim otapalom zamijenjena je vremenski bržom ekstrakcijom subkritičnom vodom koja se lakše odlaže i skladišti te je ekološki prihvatljiva. Odvija se pri temperaturi između 100°C i 374°C (kritična točka vode pri temperaturi od 374°C i tlaku od 22 MPa) te pod tlakom koji mora biti dovoljno visok da zadrži vodu u tekućem stanju (Liang i Fan, 2013). Pri ovakvim uvjetima, dielektrična konstanta vode može se lako sniziti povećanjem temperature. Dielektrična konstanta vode pri sobnoj temperaturi i tlaku iznosi 79 dok se povećanjem temperature na 250°C i pod tlakom od 5 MPa, potrebnog za održavanje tekućeg stanja, reducira na 27 (Uematsu i Franck, 1980). Povećanjem temperature pri umjerenom tlaku dolazi do smanjenja površinske napetosti i viskoznosti vode, što rezultira povećanjem topljivosti analita u tom otapalu. Nadalje, fenoli se ekstrahiraju pri temperaturama nižim od 100°C, manje polarne komponente kao što su pesticidi pri temperaturi od 200°C, dok se n-alkani ekstrahiraju pri temperaturama višim od 300°C.

Za pročišćavanje biološki aktivnih sastojaka iz biljaka koji imaju međusobno sličan sastav, subkritična ekstrakcija vodom neće biti dovoljna za postizanje visoke čistoće pa se kombinira s ostalim tehnikama pročišćavanja. Trenutno se subkritična ekstrakcija vodom primjenjuje za pročišćavanje organskih kiselina, flavonoida, esencijalnih ulja, pektina, tanina, proteina i laktone (Liang i Fan, 2013).

2.3. Đumbir *Zingiber officinale* i njegov učinak na ljudsko zdravlje

Đumbir, *Zingiber officinale*, višegodišnja je biljka iz porodice *Zingiberaceae*. Biljka je autohtona u jugoistočnoj Aziji, ali se uzgaja i u mnogim drugim tropskim krajevima. Pod zemljom se širi rizom, dok se iznad zemlje uspravno podiže zelena trska koja u prvoj godini rasta može doseći visinu od 60 cm. Rizom je dug 7-15 cm, čvorast, debeo, bež boje i izgleda kao „šaka“. Biljka sadrži uske kopljaste listove duge 15-30 cm koji umiru svake godine, a cvjetovi su nalik onima kod orhideja. Ima karakterističan miris i okus (Awang, 1992).



Slika 1. Biljka *Zingiber officinale* ili đumbir

Provedena su brojna istraživanja koja pokazuju različite farmakološke učinke đumbira. Sadrži nekoliko biološki zanimljivih sastojaka i posjeduje svojstva koja utječu na zdravlje ljudi. Ljekoviti dio biljke je osušeni dio rizoma (korijena) koji ima pozitivan učinak u liječenju mučnine i povraćanja, živčanih bolesti, dijabetesa, astme, djeluje protuupalno i smanjuje bol kod reumatoidnog artritisa i osteoartritisa te zubobolje. Također, pokazuje ulogu u prevenciji tumora, inaktiviranjem i aktiviranjem različitih molekularnih puteva, te se konzumacijom sprječava opasnost od srčanog i moždanog udara.

Komponente u đumbiru su brojne i variraju ovisno o mjestu uzgoja i jesu li rizomi svježi ili sušeni. Đumbir je bogat izvor hlapljivih eteričnih ulja koji biljci daju aromu, a njihov prinos varira od 1% do 3%. Komponente eteričnih ulja dijele se na monoterpenoide (β -felandren, cineol, geraniol, kurkumin, citral, terpineol, borneol), seskviterpenoide (α -zingiberen (30-70%), β -seskvifelandren (15-20%), β -bisabolen (10-15%), zingiberol) i fenole (gingerol, gingerenon i šogaol). Trpkost svježeg đumbira ovisi o količini gingerola, od kojih je najbrojniji [6]-gingerol, a ostali gingeroli s različitom duljinom lanca prisutni su u manjim količinama. Trpkost sušenog đumbira ovisi o količini šogaola, dehidriranih oblika gingerola, i služi za dobivanje ekstrakata. Nadalje, antioksidansi se u đumbiru nalaze u niskim koncentracijama, a to su sljedeći β -karoten, askorbinska kiselina, terpenoidi, alkaloidi i polifenoli. Većina antioksidansa koji se koriste ipak je sintetski proizvedena (Ali i sur., 2008).

Točan mehanizam djelovanja i dalje nije poznat, ali jasno je da đumbir i njegovi sastojci pokazuju antioksidativno djelovanje i sprječavaju oštećenje proteina, lipida, nukleinskih kiselina te ugljikohidrata slobodnim radikalima, tako što ih neutraliziraju. Nagomilavanje slobodnih radikala narušava zdravlje i ubrzava starenje pa organizam postaje podložan nizu degenerativnih promjena (Caillet i sur., 2007). Isto tako, đumbir pokazuje protuupalno djelovanje. Ranija ispitivanja đumbirskih pripravaka i nekih izoliranih spojeva srodnih gingerolu, u *in vitro* uvjetima, pokazala su inhibiciju enzima ciklooksigenaze, što dovodi do olakšanja simptoma upale i smanjenja boli. Pokazuje i antitumorsko djelovanje tako što aktivira tumor supresorski gen i apoptozu te inhibira vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF). Također, terpenoidi izazivaju apoptozu u endometrijskim tumorskim stanicama kroz aktivaciju tumor supresorskog gena p53.

Povećanje otpornosti patogenih bakterija na antibiotike, odnosno antiinfektivne lijekove, uzrokuje smanjenje učinkovitosti antibiotika. Da bi se „doskočilo“ antibiotskoj rezistenciji, istražuju se novi hibridni antibiotici i različiti bioaktivni spojevi biljnog podrijetla, koji bi mogli pomoći u suzbijanju infekcija. Đumbir djeluje kao antimikrobni agens jer sprječava rast nekih mikrobnih vrsta kao što su bakterije: *E. coli*, *Salmonella typhi* i *Bacillus subtilis*.

Osteoartritis je jedan od vodećih uzroka mišićno-koštane boli i invaliditeta širom svijeta. Liječenje osteoartritisa putem protuupalnih lijekova daje olakšanje, ali i pokazuje razne nuspojave. Visoko pročišćeni i standardizirani đumbirski ekstrakt ima značajan učinak na smanjenje simptoma osteoartritisa koljena (Rahmani i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. HeLa stanična linija

HeLa je prva uspostavljena humana stanična linija u kulturi. Izvorne stanice potječu iz malignog tumora vrata maternice tridesetjednogodišnje afroameričke žene, Henriette Lacks, koja je umrla u listopadu 1951. godine (Landry i sur., 2013). Stanični biolog, George Gey, izolirao je stanice i uspostavio originalnu kulturu iste godine. Zbog dugovječnosti i izdržljivosti HeLa stanica, kultura je do danas postala najčešće korištena u brojnim istraživanjima širom svijeta. *In situ* hibridizacijom kromosoma utvrđena su mjesta integracije virusne DNA humanog papiloma virusa 18 (HPV 18), čime je dokazan uzrok tumora. Zbog svoje strukture, fragilna mjesta na kromosomu pogodna su za integraciju virusa što može uzrokovati reorganizaciju genetičkog materijala organizma, odnosno stanice te dovesti do potencijalno brzog i neograničenog rasta stanica. Takve stanice postaju osjetljive na egzogene kancerogene čimbenike, što povećava šansu od oboljenja (Popescu i DiPaolo, 1989).

HeLa je besmrtna tumorska stanična linija jer se stanice mogu reproducirati u kulturi na neodređeno vrijeme, a dijele se otprilike svaka 23 sata. Jednostavno se uzgajaju u standardnom mediju, jednostavna je selekcija linija s posebnim karakteristikama i mnogi virusi se lako uzgajaju u HeLa stanicama. One su prve ljudske stanice uspješno klonirane te su pomogle u otkriću broja kromosoma u ljudi. Jedna od najranijih primjena HeLa stanica bila je u razvoju cjepiva protiv polio virusa, a koriste se i za razvoj *in vitro* oplodnje (Scherer i sur., 1953).

U ovome radu korištena je humana stanična linija HeLa dobivena iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Sadrži 82 kromosoma umjesto tipičnih 46 te 4 HeLa kromosomska markera: M1, M2, M3 i M4. Uzgajana je u plastičnim T-bocama ravnih stijenki te u pločicama s jažicama u inkubatoru s 95% zraka i 5% CO₂ pri temperaturi 37°C. Za uzgoj je korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak 10% FBS.

3.1.2. Kemikalije

0,25% Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH

Fetalni teleći serum (FBS), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Fluorescein diacetat, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Kristal-ljubičasto, Kemika, Zagreb, RH

MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2Htetrazolijevazol)), Promega, SAD

Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Propidijev jodid, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Subkritični vodeni ekstrakt đumbira, Tehnološki fakultet, Sveučilište Novi Sad

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4)

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

0,4 % otopina tripan-plavo

Boja tripan plavo	0,08 g
PBS pufer	20 mL

0,2 % otopina kristal violet

Boja kristal violet	0,2 g
2% etanol	10 mL

Otopina fluorescein diacetata

Fluorescein diacetat (FDA)	5 mg
Aceton	1 mL

Otopina propidijevog jodida

Propidijev jodid (PI)	2 mg
PBS pufer	20 mL

3.1.4. Uređaji i oprema

Fluorescentni mikroskop, EVOS Fluid Cell Imaging Station, Invitrogen

Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Neubauerova komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Spektrofotometar, Thermo Scientific Genesys 10S UV/VIS, SAD

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, lijevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)

Ploče s 6 jažica, Corning, SAD

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

T-boce od 25cm², Corning, SAD

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj HeLa stanične linije u T-bocama

Stanice se čuvaju u mediju za zamrzavanje pri temperaturi -70°C . Njihov uzgoj započinje naglim uronjavanjem ampule u kojoj se stanice nalaze u vodenu kupelj, čime se postiže odmrzavanje. Slijedi centrifugiranje suspenzije 3 minute pri 1000 o/min nakon čega se supernatant ukloni pipetom, a stanice se izbroje i nacijepu u odgovarajuću T-bocu u početnoj koncentraciji od 1×10^5 stanica po mililitru, u DMEM hranjivom mediju s 5-10% (v/v) FBS. Zatim se T-boce stavljaju u inkubator na temperaturu 37°C uz atmosferu s 95% zraka i 5% CO_2 . Kultura stanica svakodnevno se pregledava pod inverznim mikroskopom pomoću kojeg se prati fiziološko stanje, brojnost, morfologija stanica te njihovo prihvaćanje za podlogu. Tijekom uzgoja treba obratiti pozornost na boju medija jer nagla promjena boje često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi. Kako bi se spriječio ulazak stanica u stacionarnu fazu zbog kontaktne inhibicije, potrebno ih je precijepiti kada pokrivenost površine prijeđe 80%. Zbog nužne tripsinizacije, postupak je relativno stresan za adherentne stanice. Redovito prihranjivanje važno je kako bi se nadomjestile komponente medija koje su iscrpljene i kako bi se uklonili proizvodi metabolizma koji mogu dovesti do promjene optimalne pH vrijednosti.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

Kako bi rezultati istraživanja bili kvalitetni, broj stanica u svakom eksperimentu mora biti definiran, stoga je potrebno prije svakog pokusa utvrditi broj stanica za nacijepljivanje. Za pripremu uzorka za brojanje stanica, stanice je potrebno tripsinizirati kako bi se odvojile od podloge u pojedinačne stanice. Pipetom se ukloni hranjivi medij iz T-boce te se doda 1 mL otopine tripsina. Kako bi se ubrzala tripsinizacija, T-boca se stavi u inkubator na višu temperaturu 3-5 minuta. Učinak tripsinizacije može se pratiti pod inverznim mikroskopom. U trenutku kada se stanice zaokruže, proces odvajanja stanica od podloge uspješno je završen pa se dodatkom 2 mL medija sa serumom stanice resuspendiraju. Budući da takav medij sadrži tripsin inhibitor, djelovanje tripsina se zaustavlja. Uzme se alikvot od 20 μL suspenzije stanica i pomiješa s 20 μL boje tripan-plavo te se 20 μL pripremljene otopine nanese u Neubauerovu komoricu za brojanje. Komorica je podijeljena na 16 kvadrata ukupne površine 1mm^2 , a broj stanica računa se tako da se srednja vrijednost stanica iz 4 kvadrata pomnoži s 5×10^3 . Žive stanice ne propuštaju velike polarne molekule reagensa u stanicu, stoga ne

dolazi do njihova obojenja. Mrtve stanice bojaju se plavo zbog oštećenja njihove membrane i posljedičnog propuštanja molekula reagensa koji se vežu na unutarstanične proteine. Broj stanica po mL suspenzije određuje se iz izraza:

$$\text{Broj stanica/mL suspenzije} = \text{srednja vrijednost broja stanica u 4 kvadrata} \times 5 \times 10^3$$

3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na HeLa staničnoj liniji

Ploča s 96 jažica naciepljuje se s prethodno uzgojenim HeLa stanicama. U svaku jažicu naciepljuje se 100 μ L suspenzije stanica početne koncentracije 5×10^4 stanica/mL. Ploče se stave u inkubator s reguliranom atmosferom na temperaturu 37 °C. Kao što je i ranije opisano, inverznim mikroskopom prati se opće stanje stanica. Nakon 24 sata od naciepljivanja, stanice se tretiraju subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira u koncentraciji 5, 10, 25, 50, i 100 mg/mL. Svaki uzorak se postavlja u pet paralela, a na ploči se nalaze i jažice za kontrolu u koje se ekstrakt ne dodaje. Nakon 48 sati od dodatka ekstrakta, MTS metodom određena je vijabilnost stanica te je izražena kao postotak živih u odnosu na kontrolne stanice.

3.2.4. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom

MTS je kolorimetrijska metoda koja se koristi za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevasol)) u obojeni, topljivi formazanski produkt. U svaku se jažicu dodaje 10 μ L MTS reagensa bez prethodnog uklanjanja medija i stanice se inkubiraju tijekom 3 sata na temperaturi 37°C pri 95 % vlažnosti zraka i 5 % CO₂. Apsorbancija se mjeri pri 490 nm na čitaču mikrotitarskih pločica. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Kao 100% proglašeni se srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica, a vrijednosti apsorbancija tretiranih uzoraka izraze se kao udio u odnosu na netretirane stanice prema izrazu:

$$\text{Preživljenje (\%)} = \frac{\overline{A_{490}} (\text{tretirane stanice})}{\overline{A_{490}} (\text{kontrolne stanice})} \times 100$$

3.2.5. Klonogeni test i bojanje HeLa stanica bojom kristal violet

Test koji se temelji na sposobnosti stanice da preraste u koloniju, a provodi se *in vitro*, naziva se klonogeni test. Pod pojmom kolonija smatra se skup od najmanje 50 stanica. Klonogenom analizom ispituje se svaka stanica u populaciji zbog sposobnosti da se neograničeno dijeli.

Prethodno uzgojene HeLa stanice, nacijepljene su u ploču sa 6 jažica u početnoj koncentraciji od 100 stanica u 2 mL medija za uzgoj. Stanice su inkubirane pri kontroliranim uvjetima atmosfere na temperaturi 37°C, a nakon toga tretirane ekstraktima đumbira u koncentraciji 10 i 40 mg/mL, dok se u kontrolne stanice ne dodaju ekstrakti. Slijedi uzgoj sve do pojave kolonija. Nakon 8 dana od tretmana, stanice su bojane otopinom kristal violet. Postupak započinje uklanjanjem medija, tripsinizacijom i ispiranjem stanica s 1 mL PBS pufera. Potom se doda 5 mL metanola za fiksaciju stanica koji se nakon 10 minuta uklanja. Ploča se ostavlja na zraku, kako bi se potpuno osušila, nakon čega se dodaje 0,5 mL boje kristal violet i pričekava 10 minuta. Posljednji korak je uklanjanje boje, ispiranje jažica s 1 mL PBS pufera i dodavanje deionizirane vode te sušenje. Kolonije se mogu izbrojati golim okom ili uporabom svjetlosnog mikroskopa.

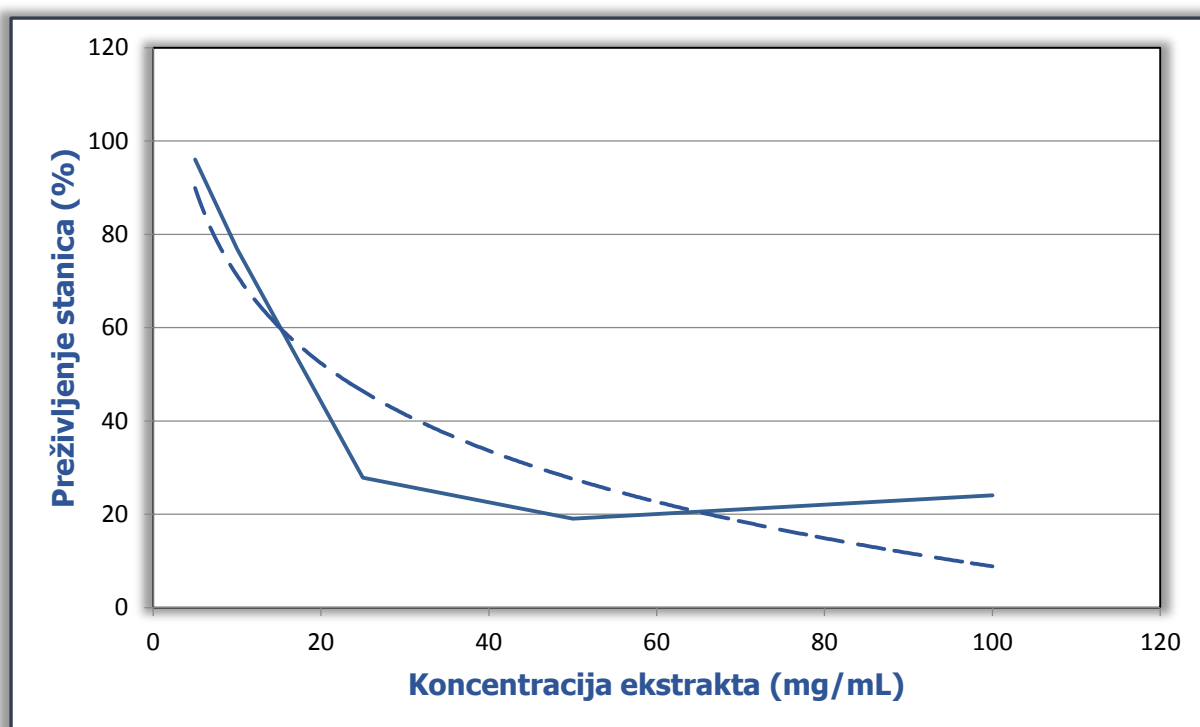
3.2.6. Fluorescentna mikroskopija

Ispitivanja temeljena na metodi fluorescencije koriste se za procjenu održivosti životinjskih stanica. Suspenzija stanica u početnoj koncentraciji 5×10^4 st./mL nacijepljena je u jažice na mikrotitarskoj ploči. Slijedi inkubacija kroz 24 sata u inkubatoru pri 37 °C i 5 % CO₂. Nakon toga uklanja se medij te se dodaju ekstrakti đumbira u sljedećim koncentracijama: 5, 25 i 50 mg/mL. Ploča sadrži sve ispitane koncentracije i kontrolnu jažicu u kojoj se nalaze netretirane stanice. Nakon 72 sata iz stanične kulture se ukloni medij te se dodaju pripremljene otopine fluorescentnih boja FDA i PI. Stanice se potom inkubiraju na sobnoj temperaturi 4-5 minuta u mraku pa se ukloni boja. Uzorak se ispere PBS-om te je spreman za analizu. Promjene u izgledu stanica, koje nastaju uslijed potaknute apoptoze i nekroze, promatraju se vizualno pomoću fluorescentnog mikroskopa povezanog s računalom i softverom koji omogućuje snimanje i obradu slike.

4. REZULTATI

4.1. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na preživljavanje HeLa stanica

Nakon što su HeLa stanice naciepljene u jažice mikrotitarske ploče, u početnoj koncentraciji 5×10^4 st/mL, tretirane su različitim koncentracijama subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira (5, 10, 25, 50 i 100 mg/mL). Nakon 48 sati od tretmana, određena je vijabilnost stanica MTS metodom. Dobiveni rezultati prikazani su kao graf ovisnosti postotka preživljenja stanica o koncentraciji korištenog ekstrakta đumbira (Slika 2).



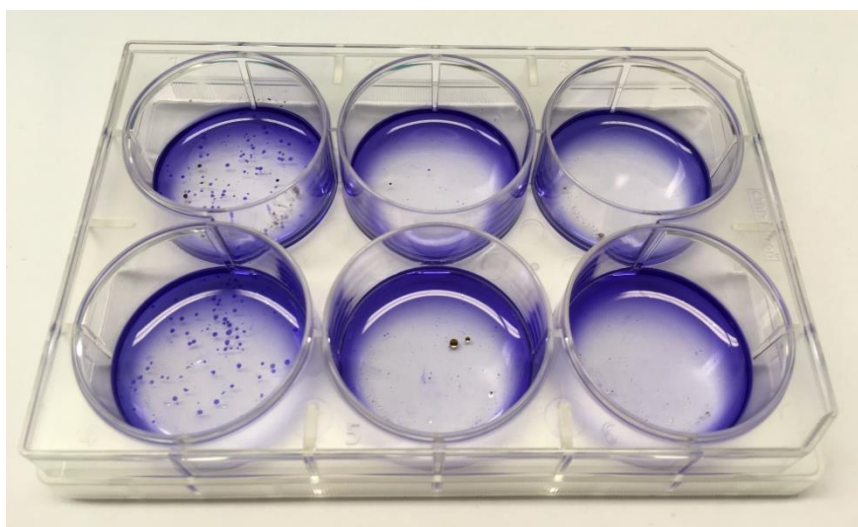
Slika 2. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na vijabilnost HeLa stanica

Iz prikazanih rezultata, vidljiv je jak inhibitorni učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na HeLa stanice pri ispitivanim koncentracijama. Minimalna koncentracija kojom su HeLa stanice tretirane iznosi 5 mg/mL i uzrokuje inhibiciju 3,99% populacije stanica, a maksimalna iznosi 100 mg/mL i uzrokuje inhibiciju 75,96% populacije. Najveći inhibitorni učinak uočen je kod tretiranja stanica koncentracijom 50 mg/mL, gdje on iznosi 80,96%.

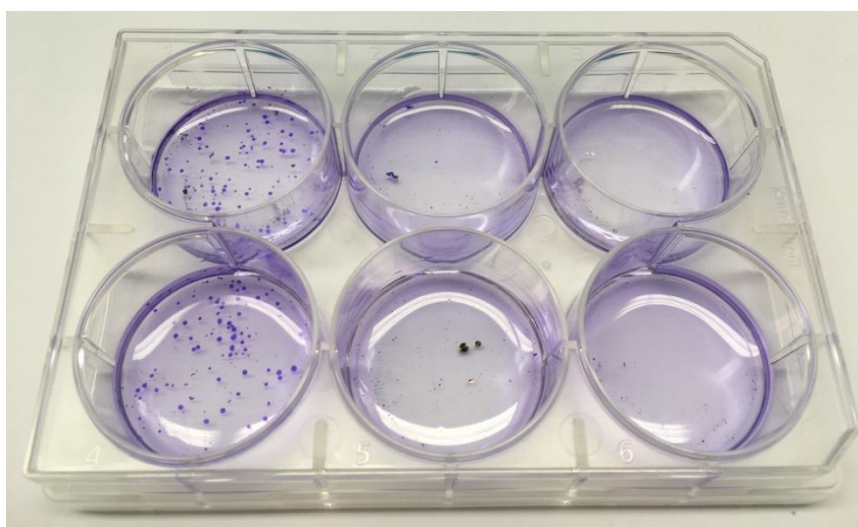
4.2. Klonogena analiza učinka subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na HeLa stanice

Stanice su naciepljene u ploču sa 6 jažica u početnoj koncentraciji od 100 stanica po svakoj jažici, a 24 h od naciepljivanja, tretirane su subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira u koncentracijama 10 mg/mL i 40 mg/mL. Nakon 8 dana od tretmana, bojanjem stanica bojom kristal violet nastale kolonije moguće je izbrojati golim okom ili uporabom svjetlosnog mikroskopa.

Kontrola 10 mg/mL 40 mg/mL



Slika 3. Porasle kolonije u jažicama prije ispiranja boje kristal violet



Slika 4. Porasle kolonije u jažicama nakon ispiranja boje kristal violet

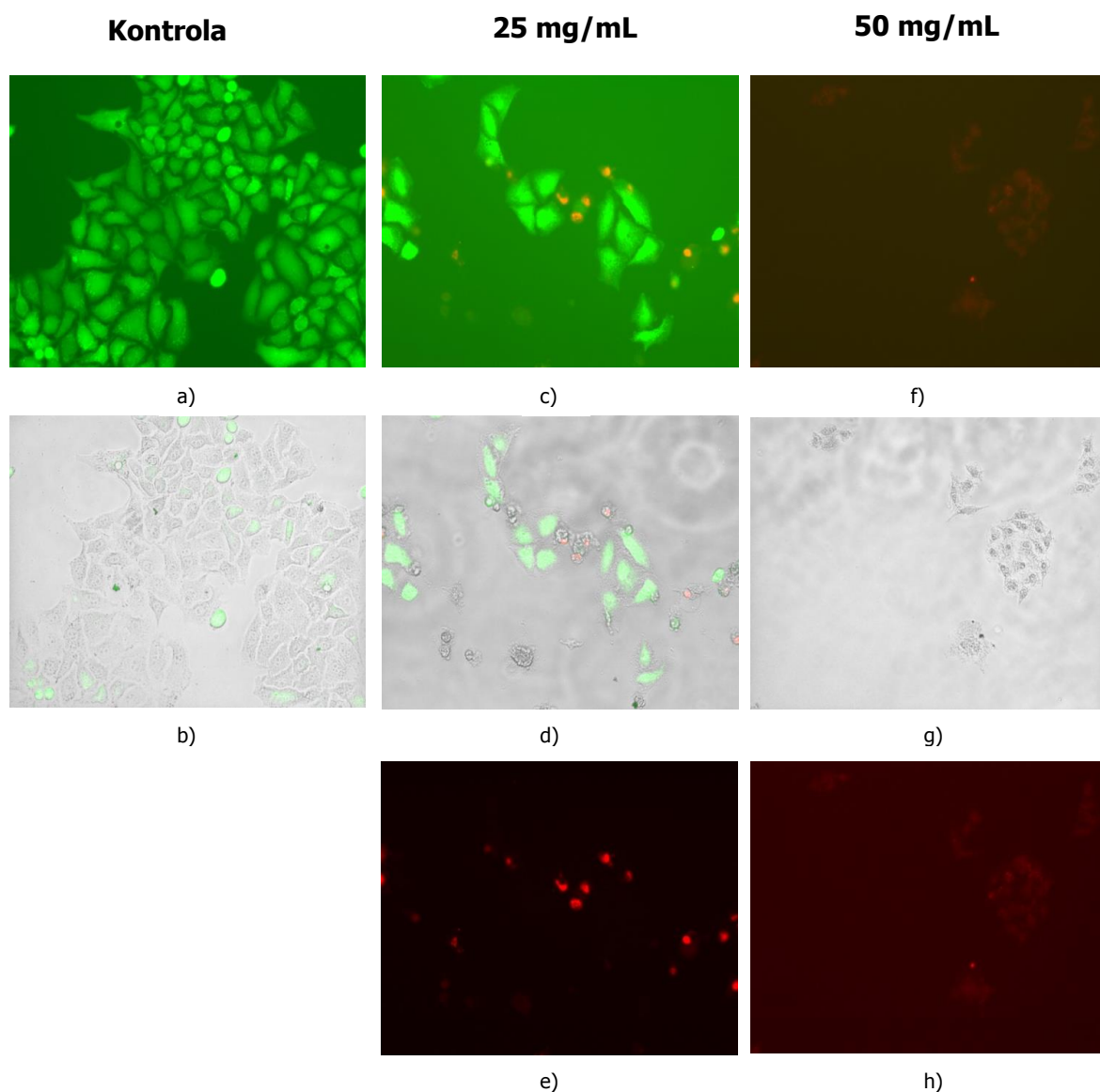
Tablica 1. Broj poraslih kolonija prilikom tretiranja stanica različitim koncentracijama ekstrakta đumbira

	Broj poraslih kolonija	
Kontrola	118	95
	$\Sigma = 107$	
10 mg/mL	36	40
	$\Sigma = 38$	
40 mg/mL	15	19
	$\Sigma = 17$	

Jažice u kojima se vidi najviše poraslih kolonija predstavljaju kontrolu odnosno netretirane stanice. Povećavanjem koncentracije dodavanog ekstrakta dolazi do opadanja gustoće kolonija, što pokazuju i vrijednosti u Tablici 1. Dobiveni rezultati u korelaciji su s rezultatima određivanja vijabilnosti MTS metodom.

4.3. Fluorescentna mikroskopija HeLa stanica nakon tretmana subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira

Nakon tretmana s odabranim koncentracijama ekstrakta: 25 mg/mL i 50 mg/mL i obojenja fluorescentnim bojama, HeLa stanice su snimljene pod fluorescentnim mikroskopom kako bi se utvrdilo je li došlo do promjena u morfologiji tretiranih i netretiranih stanica.



Slika 5. Morfološki izgled HeLa stanica promatranih fluorescentnim mikroskopom. a) i b) netretirane, kontrolne HeLa stanice i stanice tretirane 48 sati s c), d) i e) 25 mg/mL ekstrakta đumbira te f) i g) 50 mg/mL ekstrakta đumbira.

Praćenjem morfologije stanica fluorescentnim mikroskopom, vidljive su promjene ovisno o dodatku različite koncentracije vodenog ekstrakta đumbira. Žive stanice fluoresciraju zeleno, dok su apoptotičke/nekrotične stanice obojane propidijevim jodidom tj. crveno, budući da zbog oštećenja apsorbiraju tu boju u jezgri. Kontrolne, netretirane HeLa stanice veće su gustoće, formiraju pravilni monosloj i karakteristične su morfologije, što je vidljivo na slikama a) i b). Na slikama c), d) i e) može se opaziti pad gustoće i slabije formiran monosloj stanica te blaga promjena u izgledu stanica koje fluoresciraju crveno. Slike f) i g) prikazuju još veću razrjeđenost monosloja i smanjenje brojnosti stanica te promjenu u karakterističnoj morfologiji. Zapažene promjene u koleraciji su s rezultatima dobivenim MTS metodom (Slika 2).

5. RASPRAVA

Farmakognozija je znanost o ljekovitim tvarima biljnog, životinjskog i mineralnog porijekla. Procjenjuje se da je 25 % svih modernih lijekova izravno ili neizravno izvedeno iz viših biljaka. Biološki aktivne tvari, odgovorne za terapijski učinak, obično su koncentrirane u pojedinim biljnim organima (list, cvijet, plod, korijen) ili ekstraktima, a biljke ih sintetiziraju s ciljem samozaštite od abiotskih i biotskih stresnih faktora.

Mnoga ispitivanja koja se provode *in vitro* imaju svrhu određivanja citotoksičnosti, odnosno antitumorske aktivnosti biološki aktivnih spojeva te ispitivanje njihovog potencijala kao lijeka u razvojnoj fazi. Budući da su često razni učinci međusobno ovisni, navedena ispitivanja trebala bi obuhvatiti i druge tipove bioloških aktivnosti, npr. antioksidacijski kapacitet (Radojčić Redovniković, 2016).

Kulture životinjskih stanica upotrebljavaju se u svim područjima biotehničkih znanosti. Koriste se kako bi se bolje shvatile metaboličke aktivnosti unutar stanice, u ispitivanjima toksičnosti, proizvodnji terapijskih proteina, virusnih cjepiva te u proizvodnji umjetnih tkiva. Tijekom uzgoja kultura stanica, u medij za uzgoj potrebno je dodati serum životinjskog ili humanog porijekla, koji će stanicama osigurati sve sastojke potrebne za njihov rast, proliferaciju i metabolizam. Serum je ujedno i najskuplja komponenta medija za uzgoj, a s obzirom na svoj izvor postoji mogućnost prijenosa bakterija, virusa i priona te pojave određenih razlika u sastavu koje ovise o seriji proizvodnje. Posljednjih godina napravljen je veliki pomak u oblikovanju medija bez seruma koji su općenito specifičniji nego mediji sa serumom, stoga ih je potrebno razvijati za određene tipove stanica i primjene (Butler, 2004).

Stanične linije koriste se u istraživanjima malignih tumora od 1951. godine kada je George Gay, u bolnici Johns Hopkins u Baltimoreu, prvi puta uspio održati stanice malignog tumora u kulturi. Prva stanična linija dobila je ime HeLa, po Henrietti Lacks, ženi iz čijeg je karcinoma vrata grlića maternice izolirana. Do danas je ostala jedna od najkorištenijih i najvažnijih staničnih linija. Raznolikost tumora zahtijeva i raznolikost staničnih linija koje se koriste u istraživanjima, iz tog razloga danas postoji više od 1000 staničnih linija malignih tumora (Beskow, 2016).

Cilj ovog rada bio je ispitati biološki učinak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira na preživljavanje i morfološke karakteristike HeLa tumorske stanične linije. Prethodno uzgojene stanice naciepljene su u ploče s 96 jažica te uzgajane u inkubatoru 24 sata.

Osigurani su uvjeti kontrolirane atmosfere i temperatura 37°C. Zatim su tretirane subkritičnim vodenim ekstraktom đumbira u različitim koncentracijama: 5, 10, 25, 50 i 100 mg/mL. Nakon 48 sati od tretmana, određena je vijabilnost stanica MTS metodom, a dobiveni rezultati iskazani su kao graf ovisnosti postotka preživljenja stanica o koncentraciji korištenog ekstrakta đumbira (Slika 2). Rezultati pokazuju inhibitorni učinak ekstrakta na rast HeLa stanične linije, pri svim ispitanim koncentracijama. Tretman ekstraktom koncentracije 5 mg/mL uzrokuje minimalnu inhibiciju populacije stanica u iznosu od 3,99% dok se maksimalna inhibicija od 80,96% postiže prilikom tretmana s 50 mg/mL ekstrakta. Budući da je pri koncentraciji od 50 mg/mL inhibiran veći dio stanica, povećanjem koncentracije na 100 mg/mL ne dolazi do velike promjene, odnosno postotak inhibicije blago opada. Dobiveni rezultati u korelaciji su s rezultatima koji su objavili Kirana i sur. (2003.) koji su ispitivali antitumorski učinak 11 vrsta đumbira porijeklom iz Indonezije na MCF-7 i HT-29 tumorskim staničnim linijama u koncentracijama 0,015-0,25 mg/mL.

Kako bi se dalje ispitao učinak ekstrakata đumbira na HeLa stanice, napravljena je klonogena analiza ekstrakata u koncentracijama 10 mg/mL i 40 mg/mL. Zatim su stanice bojane kristal violet bojom (Slika 3), a nakon ispiranja porasle kolonije moguće je izbrojati golim okom ili uporabom svjetlosnog mikroskopa (Slika 4). Dobiveni rezultati pokazuju najveći broj poraslih kolonija u kontrolnoj jažici s netretiranim stanicama. Vrijednosti u Tablici 1. prikazuju opadanje broja kolonija povećanjem koncentracije ekstrakta, a što je u skladu s rezultatima preživljavanja stanica određenih kolorimetrijskom MTS metodom.

Za praćenje morfologije tretiranih i netretiranih HeLa stanica primjenom fluorescentnog mikroskopa, stanice su tretirane s 25 i 50 mg/ml ekstrakta đumbira i bojane fluorescentnim bojama: fluorescein diacetata (FDA) i propidijevog jodida (PI). Upotreba dviju fluorescentnih boja uzrokuje vidljivu razliku među živim i mrtvim stanicama u populaciji. Stanice se boja otopinom FDA i otopinom PI. Fluorescein diacetat preuzet je iz stanica koje konvertiraju nefluorescentni FDA u zeleni fluorescentni metabolit fluorescein i služi za bojanje živih stanica zelenom bojom. Konverzija jednog tipa u drugi ovisna je o enzimu esterazi. Suprotno tome, propidijev jodid ne može proći kroz staničnu membranu žive stanice, već do jezgre dolazi prolazeći kroz narušenu strukturu mrtvih stanica te ulazi u interakciju s dvostrukom ovojnicom deoksiribonukleinske kiseline (DNK) u stanici i fluorescira crvenom bojom. Praćenjem morfologije stanica fluorescentnim mikroskopom, vidljive su promjene ovisno o dodatku različite koncentracije vodenog ekstrakta đumbira. Kontrolne, netretirane HeLa stanice veće su gustoće, formiraju pravilni monosloj i fluoresciraju zeleno. Prilikom tretmana s 25 mg/mL ekstrakta može se opaziti pad gustoće, stanice fluoresciraju zeleno, a mogu se

uočiti i stanice u apoptozi koje fluoresciraju crveno. Tretman ekstraktom u koncentraciji od 50 mg/mL uzrokuje još veću pojavu stanica u kasnoj fazi apoptoze i nekroze. Sličan učinak pokazali su etanolni ekstrakti đumbira na tumorskim staničnim linijama HCT 116 i HT 29 pri čemu je ekstrakt povećao broj stanica u ranoj i kasnoj fazi apoptoze (Shailah i sur., 2010). Naime, spojevi koji mogu povećati apoptozu u tumorskim stanicama mogu se smatrati dobrim kemoprotektivnim agensima tj. imaju potencijal antitumorskog djelovanja.

Temeljem provedenih istraživanja, može se zaključiti da dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta biljke *Zingiber officinale* u medij za uzgoj HeLa stanica, inhibira njihov rast, a biološki aktivni spojevi u đumbiru imaju potencijal za daljnje istraživanje i razvoj kao kemopreventivno i/ili terapijsko sredstvo.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata iz provedenog pokusa, može se zaključiti sljedeće:

1. Dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira u koncentracijama: 5, 10, 25, 50 i 100 mg/mL pokazuje inhibitorni učinak na rast i proliferaciju HeLa stanica. Inhibiciju izazivaju sve ispitivane koncentracije i to u rasponu 3,99-80,96%.
2. Klonogenom analizom utvrđeno je kako HeLa stanice imaju sposobnost stvaranja kolonija, a broj poraslih kolonija u ovisnosti je o koncentraciji dodanog subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira.
3. Fluorescentnom mikroskopijom potvrđeno je da dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta đumbira uzrokuje morfološke promjene u HeLa staničnoj liniji.

7. LITERATURA

Ali B. H., Blunden G., Tanira M. O., Nemmar A. (2008) Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 409-420

Awang D.V.C. (1992) Ginger. *Canadian Pharmaceutical Journal* **125**: 309–311.

Beskow L.M. (2016) Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **17**: 395–417.

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. (2010) Serum-free cell culture: The serum-free media interactive online database. *Alternatives to Animal Experimentation* **27**: 53-62.

Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izdanje, (Bushell G., ured). Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.

Caillet S., Yu H., Lessard S., Lamoureux G., Ajdukovic D., Lacroix M. (2007) Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chemistry* **100**: 542-552.

Castilho L., Moraes Â., Augusto E. F. P., Butler M. (2008) *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, 1.izdanje, Taylor & Francis Group, Abingdon.

Cooper G.M., Hausman R.E. (2004) Stanica - Molekularni pristup, 3.izd., Medicinska naklada Zagreb, str. 631-670.

D'Herde K., Mussche S., Roberg K. (2003) Morphological changes in dying cells. U: *Cell Proliferation & Apoptosis* (Huges D., Mehmet H., ured.), BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, str. 201-206.

Eagle H. (1973) The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. *Journal of Cellular Physiology* **82**: 1-8.

Eibl D., Eibl R., Pörtner R. (2009) Mammalian cell culture technology: An emerging field. *Cell and Tissue Reaction Engineering* **1**: 3-8.

Freshney I.R. (1987) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Inc., New York, str. 796.

Freshney I.R. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5.izdanje, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, str. 115-128.

Gaurina Srček V., Radošević K., Jukić S., Slivac I. (2016) Bioreactors for animal cell cultivation. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 18-27.

Hendrick V., Ribeiro de Sousa D., dosSantosPedregal A.D.S, Bassens C., Rigaux P., Sato K., Kotarsky K., Werenne J. (2006) Expression of recombinant protein in CHO and HeLa cells and its follow-up using EGF reporter gene. U: *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects* (Ijima, S. iNishijima K.I, ured.), Springer, Nizozemska, str. 55-59.

Huie C.W. (2002) A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medical plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **373**: 23-30.

Jones K. H., Senft J. A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **33**: 77-79.

Kirana C., Record I.R., McIntosh G.H., Jones G.P. (2003) Screening for Antitumor Activity of 11 Species of Indonesian Zingiberaceae Using Human MCF-7 and HT-29 Cancer Cells. *Pharmaceutical Biology* **41:4**, 271-276.

Kniewald J., Kmetič I., Gaurina Srček V., Kniewald Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **56**: 195-204.

Landry M.J.J., Pyl T.P., Rausch T., Zichner T., Tekkedil M.M., Stütz M.A., Jauch A., Raeka S., Aiyar S.R., Pau G., Delhomme N., Gagneur J., Korbel O.J., Huber W., Steinmetz M.L. (2013) The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **3**: 1213-1224.

Liang X., Fan Q. (2013) Application of sub-critical water extraction in pharmaceutical industry. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering* **1**: 1-6.

Macville M., Schröck E., Padilla-Nash H., Keck C., Ghadimi B.M., Zimonjic D., Popescu N., Ried T. (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Research* **59**: 141–150.

Mahady G.B., Pendland S.L., Yun G.S, Lu Z., Stoia A. (2003) Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the Gingerols Inhibit the Growth of Cag A+ Strains of *Helicobacter pylori*. *Anticancer Research* **23**: 3699–3702.

Popescu N. C., DiPaolo J. A. (1989) Preferential sites for viral integration on mammalian genome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **42**: 157-171.

Prokop A., Rosenberg M. Z. (1989) Bioreactor for mammalian cell culture. *Vertebrate Cell Culture II and Enzyme Technology* **39**: 30-67.

Radojčić Redovniković I., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) The use of cell cultures for determination of biological activity of the compounds from plants. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**: 169-175.

Rahmani A. H., Shabrmi F. M., Aly S. M. (2014) Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. *International journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* **6**: 125-136.

Scherer W.F., Syverton J.T., Gey G.O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses, IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from a epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine* **97**: 695-710.

Shailah A, Siti Amalina Z A, Noor Azian M, Makpol S, Wan Zurinah W N, Mohd Yusof Y M (2010) Ginger extract (*Zingiber officinale*) triggers apoptosis and G0/G1 cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. *African Journal Of Biochemistry Research* **4**: 134-142.

Slivac I, Gaurina Srček V., Radošević K. (2016) Osnove tehnologije životinjskih stanica. Interna skripta Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uematsu M., Franck E. U. (1980) Static Dielectric Constant of Water and Steam. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **9**: 1291-1306.

Witkowski J.A. (1979) Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture. *Medical History* **23**: 279-296.